

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-094621

(43)Date of publication of application : 12.04.1996

(51)Int.Cl.

G01N 33/547

G01N 33/543

(21)Application number : 06-231186

(71)Applicant : UNITIKA LTD

(22)Date of filing : 27.09.1994

(72)Inventor : YABUSHITA YASUKI

KOIKE NORIO

OKADA KEIJI

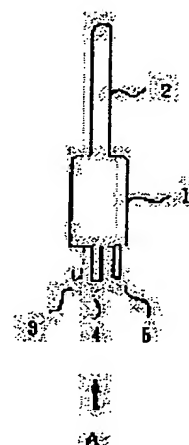
HANADA MASAKO

## (54) ANTIBODY DETECTION MATERIAL AND ANTIBODY DETECTION METHOD USING IT

## (57)Abstract:

**PURPOSE:** To stably identify and detect a plurality of antigen in a body to be inspected, particularly, pathogen factors by combining antibody having marked enzyme thereon wherein antibody is caught on antigen fixed on a macromolecule formation, reacting a matrix of the marked enzyme therewith, and producing insoluble formation.

**CONSTITUTION:** Antibody detection material is formed by bonding or sandwiching antigen immobilizing macromolecule formations 3-5 on a plurality of places of the end of a base material 1. After an shaft part 2 is held and the antigen fixation macromolecule formations 3-5 is reacted with a body to be inspected by the antibody detection material, antibody for a plurality of pathogen factors can be identified and detected by using antibody having a marker enzyme. As a result, antibody can be quickly and simply identified and detected without any need of particular analyzers.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-94621

(43) 公開日 平成8年(1996)4月12日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/547				
33/543	5 6 5 E			

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平6-231186	(71) 出願人	000004503 ユニチカ株式会社 兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地
(22) 出願日	平成6年(1994)9月27日	(72) 発明者	藪下 安紀 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
		(72) 発明者	小池 紀夫 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
		(72) 発明者	岡田 圭史 京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株式会社中央研究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体検出材料及びこれを用いた抗体検出方法

(57) 【要約】

【構成】 1種類の抗原を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基材上に複数設けたことを特徴とする抗体検出材料及びこれを用いた抗体検出方法。

【効果】 特別な分析装置を必要とせず、検体中の複数の抗原、特に病原因子に対する抗体を極めて迅速・簡便に鑑別・検出することが可能である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 1種類の抗原を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基材上に複数設けたことを特徴とする抗体検出材料。

【請求項2】 1種類の抗原を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基材上に複数設けた抗体検出材料を用いて病原因子に対する抗体を抗原抗体反応により検出するに際し、上記高分子成形体に固定化された抗原に抗体を捕捉させた後、上記抗体に対する標識酵素を有する抗体を結合させ、その標識酵素を基質と反応させて、不溶性生成物を生成させることを特徴とする抗体検出方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床検査の分野で利用される抗原固定化高分子材料及びそれを用いた抗体検出法に関し、詳しくは高分子成形体表面で複数の病原因子に対する抗体を特別な分析装置を必要とせず、極めて迅速に直接肉眼により鑑別・検出できる抗原固定化高分子材料及びそれを用いた抗体検出方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】生体内の抗体産生系において、患者の免疫状態の検査、各種病原因子の感染、免疫細胞の性質、薬剤の作用、副作用等を調べるためには、検体中あるいは培養細胞上清中に存在するこれら抗原に対する抗体を検出、定量する必要がある。抗体を検出する方法としては、一般的に抗体を産生する細胞数を測定する方法や、酵素免疫測定法等が挙げられる（今井康之「新生化学実験講座12 分子免疫学I」東京化学同人、1989）が、このうち酵素免疫測定法を用いた方法は抗原-抗体反応を利用するため特異性、迅速性、簡便性等の点で優れ、しかも直接検体を検索でき、極めて迅速な検出が可能となり得るものとして期待される。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】近年、これら酵素免疫測定法を用いた抗体の検出方法は盛んに研究されてきており、その一つにラテックス粒子に抗原を非特異的に吸着させ抗原抗体反応に伴うラテックスの凝集反応を調べる方法（ラテックス凝集法）があるが、感度が比較的低く検査時間がかかり、判定が難しく安定した結果が得られにくい等、取り扱いに関する問題点も有していた。

【0004】また、現在多く用いられてきている方法の1つに、病原因子等の抗原をタンパク質と高分子材料との間の疎水的相互作用により物理的に吸着させる方法がある。その代表的なものとしてポリスチレンからなるマイクロプレートやポリスチレン、ナイロン、アガロース、ガラス等のビーズを用いて、これと検体を反応させた後酵素標識抗原または抗体を加え、プレートやビーズに回収された酵素活性を測定する方法がある。この時、

反応液中の基質が分解して生ずる生成物が近紫外(190~400nm)または可視(400~800nm)領域における吸収をもつかあるいは蛍光物質を生ずるとき分光機器を用いて検出測定を行っている。

【0005】しかし、上記2つの免疫学的方法は一つの抗体に対して一つの反応液から検出する反応系をとっており、複数の病原因子に対する抗体を一つの反応液より同時に検出することは不可能であった。また、この検出系で複数の病原因子に対する抗体を同時に検出するためには検出したい抗体の種類の数だけの検体、試薬が必要となり、検出反応の系列数、検出時間、検体数等が共に増加するために、簡便性、迅速性、コストの点で大きな問題点があった。

【0006】このように複数の病原因子に対する抗体を同時に、簡便かつ迅速に、鑑別・検出するためには、一つの材料にそれぞれの病原因子すなわち抗原を固定化した固相を複数組合わせ、さらに抗原を固定化した固相自体に発色等の可視的变化を起こさせる方法が考えられる。また、一つの材料に、抗原を固定化した固相を複数組合わせるためには、それぞれの抗原を固定化した固相を短時間でも乾燥条件下に置く必要がある。

【0007】現在、広く一般に用いられている抗原タンパクと固相の固定化方法としては物理的吸着による方法があるが、この方法で得られた抗原固定化高分子成形体を用いて抗体を検出する場合、タンパク質と高分子成形体とが非特異的な疎水的相互作用により結合しているため、結合が不安定で、乾燥条件下に置くと固相に結合させた抗体が容易に脱離し、その結果感度が低くなったり、再現性が悪い等の問題が生じた。このため抗原タンパクを物理的吸着させた固相は乾燥条件下に置くことは不可能であった。

【0008】一方、化学的に高分子材料と抗原タンパクを固定化する方法を用いた場合、得られた抗原固定化高分子成形体は、上記物理的吸着により固定化した場合と比較して、抗体と高分子成形体が安定に結合しているにもかかわらず、溶液中に保存しなければならず、その保存期間も4週間程度と比較的に短いものであった。また、化学的に固定化した抗体固定化高分子成形体を用いて検出を行った場合、抗体結合量に比べて検出感度が低いという問題があった。このため、化学的固定化方法は、効率的に抗原を固定化する方法、安定な状態で保存可能な抗原固定化高分子成形体を得るための方法として必ずしも適した方法ではなかった。現在知られている化学的固定化方法の代表的なものには、ヒドラジド基を導入したポリスチレンをグルタルアルデヒド処理したものに抗体等の免疫物質を固定化する方法（石井 勝：臨床検査、vol.34、759（1990））、アルキルアミノ基を導入したポリスチレンをグルタルアルデヒド処理したものに抗体等の免疫物質を固定化する方法（石川栄治監訳「エンザイムイムノアッセイ」東京化学同人、1989年）、サン

ガー試薬を導入したポリスチレンをグルタルアルデヒド処理したものに抗体等の免疫物質を固定化する方法(Sanger: Biochem. J., 39, 507 (1945))、部分加水分解したナイロンをグルタルアルデヒドまたはカルボジイミド処理したものに固定化する方法(Hendry, Herrmann: J. Immunol. Methods, 35, 285 (1980))、アルキルアミノ基を導入したポリスチレンに無水コハク酸を作用させ、得られたカルボキシル基と抗原タンパクのもつアミノ基とをカルボジイミドを用いて結合させる方法(石井 勝: 臨床検査, vol. 34, 759 (1990))等がある。しかし、これらの方法は高分子成形体表面上の1つの反応基に対して1分子の抗原タンパクを結合させるものであり、また比較的に厳しい反応条件下で抗原溶液と反応させなければならぬので、固定化反応に際して多量の抗原タンパクが必要である等の問題点があり、効率的な固定化方法ではない。

【0009】本発明は特別な分析装置を必要とせず、検体中の複数の抗原、特に病原因子、に対する抗体を極めて迅速・簡便に、しかも安定に鑑別・検出することが可能な抗体検出材料及びそれを用いた抗体検出方法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決する手段】本発明者らは上記のごとき問題点を解決するために鋭意検討した結果、1種類の抗原、特に病原因子を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を病原因子に対する抗体ごとく作製し、これらを複数組合わせて得られる抗体検出材料を用いて、検体中の病原因子に対する抗体を抗原抗体反応により検出することにより、直接肉眼で複数の病原因子に対する抗体を同時に検出することができることを見出し、本発明に到達した。

【0011】すなわち、本発明は1種類の抗原を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基材上に複数設けたことを特徴とする抗体検出材料、及び、1種類の抗原を酸無水物基を介して共有結合により固定化した高分子成形体を基材上に複数設けた抗体検出材料を用いて病原因子に対する抗体を抗原抗体反応により検出するに際し、上記高分子成形体に固定化された抗原に抗体を捕捉した後、上記抗体に標識酵素を有する抗体を結合させ、その標識酵素の基質と反応させて、不溶性生成物を生成させることを特徴とする抗体検出方法を要旨とするものである。

【0012】以下、本発明を詳細に説明する。本発明における抗原とは、生体内で抗体を産生させ得る物質であり、一般的にはペプチド、タンパク質、多糖類、糖タンパク等の物質であるが、本発明に適した物質としては、例えば結核菌等の細菌、カンジダ等の真菌、肝炎ウィルス、エイズウィルス、ヘルペスウィルス、ポリオウィルス等のウィルス等の病原微生物、ボツリヌス毒素、破傷風毒素、テトロドトキシン等の毒素等の病原因子が挙げ

られる。

【0013】本発明における抗体検出材料は抗原を固定化した高分子成形体と、これらを複数設けた基材とからなる。抗原を固定化する高分子成形体の形状としてはフィルム、シート、チューブ、繊維、スティック等の形状が挙げられる。また、材質としては例えばエチレン-酢酸ビニル共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリウレタン、ポリエチレン、ポリスチレン、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート等の合成高分子、デンプン、グルテン、セルロース、天然ゴム等の天然高分子及びそれらの誘導体が挙げられる。また、疎水基を持ったアガロース誘導体、キチン、ニトロセルロースや、それらの誘導体等も挙げられる。

【0014】本発明における基材の形状としては、スティック状、スリップ状、チューブ状等が挙げられる。基材の材質としては有機高分子材料、無機高分子材料を問わないが、例えば有機高分子材料としては、ポリエチレン、ポリプロピレン等の材料表面に反応性官能基を持たない材料が好ましい。

【0015】抗原を固定化した高分子成形体(以下、抗原固定化高分子成形体)と基材との組合わせ方は、複数の抗体を同時に鑑別・検出することができる組合わせであればいかなるものでもよい。高分子成形体と基材との組合わせ方の例を図面を用いて説明する。

【0016】図1は円筒状チップを基材とし、複数のシート状の抗原固定化高分子成形体を有する抗体検出材料の例である。基材1の端部の複数箇所に抗原固定化高分子成形体3、4、5をそれぞれ接着または挟み込むことにより抗体検出材料が形成されている。この抗体検出材料は、軸部2をつまみ、抗原固定化高分子成形体3、4、5を検体と反応させた後、標識酵素を有する抗体を用いることにより、複数の病原因子に対する抗体を鑑別・検出することができる。

【0017】図3は円筒状チップを基材とし、複数のロッド状の抗原固定化高分子成形体を有する抗体検出材料の例である。基材1の端部の複数箇所に抗原固定化高分子成形体6、7、8をそれぞれ接着または挟み込むことにより抗体検出材料が形成されている。この抗体検出材料は、軸部2をつまみ、抗原固定化高分子成形体6、7、8を検体と反応させた後、酵素標識抗体を用いることにより、複数の病原因子に対する抗体を鑑別・検出することができる。

【0018】図5はスリップ状の基材に、複数のシート状の抗原固定化高分子成形体を有する抗体検出材料の例である。基材9の複数箇所に抗原固定化高分子成形体10、11、12をそれぞれ平面的に接着することにより抗体検出材料が形成されている。この抗体検出材料は、基材9をつまみ、抗原固定化高分子成形体10、11、12を検体と反応させた後、酵素標識抗体を用いることにより、複数の病原因子に対する抗体を鑑別・検出する

ことができる。

【0019】その他の例として、ロッド状の抗原固定化高分子材料を数本縦に積み重ねることにより得られる1本のスティック状の抗体検出材料、1本の円筒状の基材に繊維状の抗原固定化材料をホウキ状に束ねることにより得られる抗体検出材料等が挙げられる。

【0020】本発明では高分子成形体表面に抗原が酸無水物基を介して共有結合により固定化されているが、これは酸無水物基と抗原の有するアミノ基、チオール基等との間で共有結合が起きるためである。酸無水物基を介して抗原を高分子成形体に固定化する方法としては、高分子成形体表面に存在する酸無水物基と抗原を結合させてもよいし、高分子成形体表面に存在する他の反応性官能基に酸無水物基を導入し、この酸無水物基を介して化学的に抗原を固定化することもできる。また、酸無水物基、反応性官能基のいずれも高分子成形体表面にない場合には、成形体表面に直接酸無水物基を導入して抗原を固定化してもよいし、あるいは反応性官能基を導入した後、酸無水物基を導入して抗原を固定化してもよい。

【0021】高分子成形体表面に存在する酸無水物基以外の反応性官能基としてはカルボキシル基、ホルミル基、アミノ基、アジド基、イソシアネート基、クロロホルミル基、エポキシ基等が挙げられる。

【0022】高分子成形体表面に反応性官能基を導入する方法としては、例えばエチレン-酢酸ビニル共重合体にカルボキシル基を導入する場合は、エチレン-酢酸ビニル共重合体をケン化した後、カルボキシメチル化することにより導入される。また、カルボキシル基はヒドラシル基を経てアジド基に誘導することができるエチレン-酢酸ビニル共重合体にアミノ基を導入するには、例えばケン化したエチレン-酢酸ビニル共重合体をアミノアセタール化すればよい。ナイロンに大量のアミノ基を導入するには、例えばナイロンを酸処理し、表面を加水分解して、カルボキシル基を露出した後、ポリエチレンジアミン等のポリアミンを作用させればよい。

【0023】また、反応性官能基が存在しない高分子化合物はアンモニア-プラズマ処理や $\gamma$ 線、電子線等の放射線処理によりアミノ基等の目的とする反応性官能基を導入することが可能である。ポリウレタン等のポリアミンについては予めアミノ基が存在するので、そのまま酸無水物基を有する高分子化合物と反応させることができる。

【0024】高分子成形体表面に導入する酸無水物基を有する高分子化合物としてはスチレン-無水マレイン酸共重合体、エチレン-無水マレイン酸共重合体、メチルビニルエーテル-無水マレイン酸共重合体等が挙げられる。また、例えばポリウレタンに無水マレイン酸を $\gamma$ 線や電子線によりグラフト重合させ酸無水物基を直接導入することもできる。

【0025】抗原の固定化処理を行う際、例えば抗原を

含む溶液を用いて処理できるが、この時使用する抗原溶液としては、抗原を好ましくは水、生理食塩水あるいは緩衝液に、好ましくは10~1000倍の濃度に希釈した溶液を用いることができる。抗原溶液中には必要に応じて抗菌剤、安定化剤等を含んでいても良く、また抗原溶液で処理を行うに際しての温度、時間の条件は、好ましくは常温以下の温度で、好ましくは1時間以上である。

【0026】本発明は抗原を固定化した高分子成形体を用いて抗体を直接捕捉するが、その検出法として例えばサンドイッチ ELISA法を用いる。これは、目的とする抗体を捕捉するための抗原を固定化した高分子成形体に、検出する抗体を含む試料を作用させ、次いで、抗体を補足した高分子成形体に、酵素を標識した免疫反応体、例えば抗原や捕捉したイムノグロブリンに対する抗体、プロテインA、プロテインG等を作用させた後、目的とする抗体に結合した免疫反応体に標識された酵素の活性を、酵素に対する基質を用いて検出する方法である。

【0027】検出に用いられる酵素としてはベルオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、カルボニックアンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。一方、酵素以外に検出に用いられる標識体として金コロイド粒子、銀コロイド粒子等が挙げられる。また、アビジン-ビオチンを用いたり抗体結合性を持つプロテインA、プロテインGやレクチンを介して標識体を導入させる方法等も用いられる。

【0028】本発明に用いる不溶性生成物を生ずる酵素の基質については、例えば標識酵素としてベルオキシダーゼを使用する場合には4-クロロ-1-ナフトールや3, 3'-ジアミノベンジジン、 $p$ -フェニレンジアミン塩酸とピロカテコールからなるHanker-Yates (HY) 試薬、3-アミノ-9-エチルカルバゾール、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン等の基質が用いられ、アルカリフォスファターゼを使用する場合にはニトロブルーテトラゾリウムや $\beta$ -ナフチルリン酸と5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸や $m$ -フェナジンメトサルフェート等を混合した基質等が用いられる。グルコースオキシダーゼを使用する場合にはニトロブルーテトラゾリウムと $m$ -フェナジンメトサルフェートを混合した基質等が用いられる。

【0029】本発明の抗体検出材料を用いて複数の抗体を検出するには、まず検体と反応させる前に、材料表面の非特異的に抗体等と結合する部分を抗血清や非干渉性のタンパク質でブロックする操作(ブロッキング)を行うことが好ましい。ブロッキングに使用されるタンパク質はウシ血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン、ヘモグロビン、ゼラチン等が挙げられ、これらタンパク質を0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.2)あるいはリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解して、

37℃, 1.5時間または4℃, 一晚材料と反応させればよい。反応後は材料を0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレート (Tween 20), 0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液にて2~6回洗浄する。

【0030】本発明に用いる検体としては、血液、血清、体液等のヒト患者由来の材料、または抗体を産生する細胞の培養液等を用いることができる。患者材料を直接検体とする場合は、検体を0.05% Tween 20, 0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液等で2~5

10

0倍に希釈して用いることが好ましい。また、抗体そのものを検体として用いる場合には、抗体を蒸留水、緩衝液等で希釈したものをいれればよい。

【0031】抗体を捕捉した高分子成形体は、次にそれぞれの捕捉された検体と同じ動物種のイムノグロブリンに対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の標識物を500~2000倍希釈した0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液等に作用させる。この時の反応条件は室温~37℃で10~90分間が好ましい。上記ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の標識物の代わりに、捕捉したそれぞれの抗体に対する抗原に直接標識酵素を結合させたものを作用させてもよい。また、抗体を捕捉した高分子成形体に、捕捉した抗体と同じ動物種のイムノグロブリンに対する抗体を作用させた後に、上記標識抗体を作用させてもよい。反応後は材料を0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレート, 0.9%塩化ナトリウムを含む10mMトリス-塩酸緩衝液またはリン酸緩衝液にて2~6回洗浄する。

20

【0032】上記の様に反応させて得られた高分子成形体は、酵素反応後に可溶性生成物または不溶性生成物を生ずる酵素基質溶液に反応させるが、水溶液に対する溶解度の低い基質を用いる場合はジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド (DMF)、メタノール、エタノール等の有機溶媒に予め溶解した後に水溶液に混合したものをいいる。

【0033】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒 (TDH)、コレラ菌のコレラ毒素 (CT)、毒素原性大腸菌の定着因子 (CFA/III) をそれぞれ固定化した3枚のナイロンスリッパを組合わせた病原因子検出材料を用いて腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒 (TDH) を鑑別・検出した結果を以下に示した。

【0034】腸炎ビブリオのTDHは、次の方法で得た。すなわち *Vibrio parahaemolyticus* T-4750 (この微生物は大阪大学微生物病研究所の保有菌であり、「健康又は環境に対し害を及ぼし、又は及ぼす恐れのある性質を有する微生物」として工業技術院生命工学工業技術研

50

究所に寄託することができないものである。) をペプトン食塩培地 (1%ペプトン (Difco 社製), 3%塩化ナトリウム) で37℃, 20時間振盪培養し 10,000rpm, 20分間の遠心分離により培養上清を得た。上清に56g/100mlの硫酸アンモニウムを加え生じた沈殿を10mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.2) に溶解した。同緩衝液で透析した後、2gの臭化シアン活性化 Sepharose 4B (Pharmacia 社製) に10mgの精製した抗TDHイムノグロブリンを結合させることにより得られるイムノアフィニティカラムにかけ 0.5M塩化ナトリウムを含む 0.2Mグリシン-塩酸緩衝液 (pH2.7) で溶出させることによりTDHの精製を行った。コレラ菌のCTは SIQMA社より購入したものをいいた。毒素原性大腸菌の定着因子CFA/IIIは次の方法で得た。すなわち、*Escherichia coli* 260-1 (この微生物は大阪大学微生物病研究所の保有菌であり、「健康又は環境に対し害を及ぼし、又は及ぼす恐れのある性質を有する微生物」として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託することができないものである。) をCFA寒天培地 (1% Casamino Acids (Difco 社製), 0.15%酵母抽出物 (Difco 社製), 0.005%硫酸マグネシウム, 0.0005%塩化マンガン, 2%寒天) で37℃, 20時間培養した後、遠心分離により菌体を回収し、1mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.4) に懸濁し、ホモジナイザー (Ultra Turrax, Janke & Kunkel KG 社製) にて冷却しながら3分間ホモジネートした。得られたホモジネートは15,000×g, 20分間, 4℃遠心分離することにより上清を得て、更に50,000×g, 60分間遠心分離したものを、粗液とした。粗液は、1mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) で平衡化させたSepharose 4B (2.2×75cm: Pharmacia社製) カラムにかけた後、4Mの濃度になるように塩化ナトリウムを加え、フェニル-Sepharose CL-4B (Pharmacia 社製) を4M塩化ナトリウムを含む2mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) で平衡化させたカラムにかけ、4.0~0Mまでの塩化ナトリウムの直線濃度勾配を含む2mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8) で溶出させることによりCFA/IIIの精製を行った。

30

【0035】腸炎ビブリオのTDH、コレラ菌のCT、毒素原性大腸菌のCFA/III に対するそれぞれのポリクローナル抗体は以下の方法により得た。すなわち、精製毒素を25μg/mlになる様に 0.9%塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液 (pH7.2: 以下PBSと略す) に溶解し、これに等量の Freund completeアジュバント (Difco 社製) を加えたものを用いて体重約2kgのウサギに免疫し、25日後再び先に調製した精製毒素溶液と等量の Freund incomplete アジュバント (Difco 社製) を加えたものを免疫させ、抗血清を得た。これに50%の硫酸アンモニウムを加え沈殿を生じさせるが、これを2回繰り返し得られた沈殿を10mMリン酸緩衝液 (pH7.2) に溶解し、同緩衝液で透析した後、得られた免疫グロブリン



をそれぞれの毒素のポリクローナル抗体として用いた。

【0036】ナイロン6（ユニチカ株式会社製）からなる縦10mm、横3mm、厚さ0.2mmのシートを3N塩酸中に30℃、30分間浸漬した後、蒸留水にて洗浄した。乾燥後10%（w/v）のポリエチレンジイミン水溶液とメタノールとの1：5混合液に室温で30分間浸漬した後、2倍量の5%ジシクロヘキシルカルボジイミドのメタノール溶液を加え、引き続き室温で2時間浸漬した。メタノールにて洗浄、乾燥後2%（w/v）無水マレイン酸-メチルビニルエーテル共重合体の脱水アセトン溶液中に室温で1時間浸漬し、アセトンにて洗浄後真空乾燥したシートを抗原の固定化に用いた。固定化はこのスリップをそれぞれ100μg/mlのTDH、CT、CFA/IIIを含む10mM酢酸緩衝液（pH4.0）に浸漬することにより行った。

【0037】TDH、CT、CFA/IIIをそれぞれ固定化した3枚のナイロンシートはプラスチック用接着剤（住友スリーエム社製）を用いて8mm径の円筒上のポリプロピレン製チップの下端部に60°間隔でくし状に接着し、これを抗TDH、CT、CFA/III抗体検出材料とした。

【0038】このようにして得た病原因子検出材料は抗体固定化高分子成形体の部分を1%ウシ血清アルブミン（BSA）を含むPBSに浸漬することによりブロッキングを行った後、1μg/mlのウサギ抗TDH抗体を含むPBSに15分間浸漬した。抗原固定化材料部分に捕捉された抗体の検出に際しては、0.05%ポリエチレンソルビタンモノラウレートを含むPBSにて洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG（Cappel社製）を500倍希釈した0.05%Tween 20を含むPBSにて常温で15分間反応させ、洗浄後0.25mMニトロブルーテトラゾリウム、0.25mM 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸を含む0.1Mトリス-塩酸緩衝液（pH8.5）に37℃、10分間浸漬することにより行った。

【0039】このように反応させた抗体検出材料はTDHを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、CT、CFA/IIIを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。また、抗体の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体検出材料の抗原固定化シート部分のいづれにも発色は認められなかった。

#### 【0040】実施例2

実施例1と同様の抗体検出材料を作製し、1μg/mlのウサギ抗CT抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の検出反応を行なった。その結果、抗体検出材料のうち、CTを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、TDH、CFA/IIIを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0041】実施例3

実施例1と同様の抗体検出材料を作製し、1μg/mlのウ

サギ抗CFA/III抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の検出反応を行なった。その結果、抗体検出材料のうち、CFA/IIIを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、TDH、CTを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0042】実施例4

ナイロン6（ユニチカ株式会社製）からなる縦5mm、横3mm、厚さ0.2mmのシートに実施例1と全く同じ方法にてTDH、CT、CFA/IIIをそれぞれ固定化し、得られた3枚のナイロンシートを縦50mm、横8mm、厚さ1mmのポリプロピレン製シートの下端部より3mm間隔にて並列に接着し、これを抗TDH、CT、CFA/III抗体検出材料とした。

【0043】この抗体検出材料を用いて実施例1と同様の操作を行い、1μg/mlのウサギ抗TDH抗体を含むPBSを検体として抗TDH抗体の鑑別・検出した。その結果、抗体検出材料のうち、TDHを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、CT、CFA/IIIを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0044】実施例5

実施例4と同様の抗体検出材料を作製し、1μg/mlのウサギ抗CT抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の検出反応を行なった。その結果、抗体検出材料のうち、CTを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、TDH、CFA/IIIを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0045】実施例6

実施例4と同様の抗体検出材料を作製し、1μg/mlのウサギ抗CFA/III抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の検出反応を行なった。その結果、抗体検出材料のうち、CFA/IIIを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、TDH、CTを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0046】実施例7

ナイロン6（ユニチカ株式会社製）からなる1.5mm径、長さ10mmのロッドに実施例1と全く同じ方法にてTDH、CT、CFA/IIIをそれぞれ固定化し、得られた3本のナイロンロッドを8mm径の円筒上のポリプロピレン製チップの下端部に60°間隔でくし状に接着し、これを抗TDH、CT、CFA/III抗体検出材料とした。

【0047】この抗体検出材料を用いて実施例1と同様の操作を行い、1μg/mlのウサギ抗TDH抗体を含むPBSを検体として抗TDH抗体を鑑別・検出した。その結果、抗体検出材料のうち、TDHを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、CT、



CFA/III を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0048】実施例8

実施例7と同様の抗体検出材料を作製し、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗CT抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の検出反応を行なった。その結果、抗体検出材料のうち、CTを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、TDH、CFA/IIIを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0049】実施例9

実施例7と同様の抗体検出材料を作製し、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗CFA/III抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の検出反応を行なった。その結果、抗体検出材料のうち、CFA/IIIを固定化したナイロンシートの部分のみに濃青色の発色が認められ、TDH、CTを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0050】実施例10

実施例1と全く同じ方法で得られたTDH、CT、CFA/IIIをそれぞれ固定化した3枚のナイロンシートと円筒上のポリプロピレン製チップで構成された抗体検出材料を用いて実施例1と同様の操作を行い、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗TDH抗体とウサギ抗CT抗体を含むPBSを検体として両抗体を鑑別・検出した。その結果、病原因子検出材料のTDHを固定化したナイロンシート部分とCTを固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、CFA/IIIを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。また、抗体の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体検出材料の抗原固定化シート部分にはいづれにも発色は認められなかった。

#### 【0051】実施例11

実施例1と同様の抗体検出材料を作製し、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗CT抗体とウサギ抗CFA/III抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の鑑別・検出を行なった。その結果、病原因子検出材料のCTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分とCFA/IIIに対する抗体を固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、TDHに対する抗体を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0052】実施例12

実施例1と同様の抗体検出材料を作製し、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗CFA/III抗体とウサギ抗TDH抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の鑑別・検出を行なった。その結果、病原因子検出材料のCFA/IIIに対する抗体を固定化したナイロンシート部分とTDHに対する抗体を固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、CTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0053】実施例13

実施例4と全く同じ抗体検出材料を用いて、実施例1と同様の操作を行い、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗TDH抗体とウサギ抗CT抗体を含むPBSを検体として両抗体を鑑別・検出した。その結果、病原因子検出材料のTDHを固定化したナイロンシート部分とCTを固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、CFA/IIIを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。また、抗体の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体検出材料の抗原固定化シート部分にはいづれにも発色は認められなかった。

#### 【0054】実施例14

実施例4と同様の抗体検出材料を作製し、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗CT抗体とウサギ抗CFA/III抗体を含むPBSを検体として、実施例1と同様にして抗体の鑑別・検出を行なった。その結果、病原因子検出材料のCTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分とCFA/IIIに対する抗体を固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、TDHに対する抗体を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0055】実施例15

実施例7と全く同じ抗体検出材料を用いて実施例1と同様の操作を行い、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗TDH抗体とウサギ抗CT抗体を含むPBSを検体として両抗体を鑑別・検出した。その結果、病原因子検出材料のTDHを固定化したナイロンシート部分とCTを固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、CFA/IIIを固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。また、抗体の含まれていないPBSを検体とした以外は先の操作と全く同じ操作を行った抗体検出材料の抗原固定化シート部分にはいづれにも発色は認められなかった。

#### 【0056】実施例16

実施例7と同様の抗体検出材料を作製し、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗CT抗体とウサギ抗CFA/III抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の鑑別・検出を行なった。その結果、病原因子検出材料のCTに対する抗体を固定化したナイロンシート部分とCFA/IIIに対する抗体を固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、TDHに対する抗体を固定化したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

#### 【0057】実施例17

実施例7と同様の抗体検出材料を作製し、1  $\mu$ g/mlのウサギ抗CFA/III抗体とウサギ抗TDH抗体を含むPBSを検体として実施例1と同様にして抗体の鑑別・検出を行なった。その結果、病原因子検出材料のCFA/IIIに対する抗体を固定化したナイロンシート部分とTDHに対する抗体を固定化したナイロンシート部分のみに濃青色の発色が認められ、CTに対する抗体を固定化

13

したナイロンシート部分には発色は認められなかった。

【0058】

【発明の効果】本発明によれば、特別な分析装置を必要とせず、検体中の複数の抗原、特に病原因子、に対する抗体を極めて迅速・簡便に鑑別・検出することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の抗体検出材料の一例を示す正面図である。

【図2】図1をA方向から見た図である。

【図3】本発明の抗体検出材料の一例を示す正面図である。

【図4】図3をA方向から見た図である。

【図5】本発明の抗体検出材料の一例を示す正面図である。

10

\*

14

\*【図6】図5をA方向から見た図である。

【符号の説明】

- 1 基材
- 2 軸部
- 3 抗原固定化ナイロンシート
- 4 抗原固定化ナイロンシート
- 5 抗原固定化ナイロンシート
- 6 抗原固定化ナイロンロッド
- 7 抗原固定化ナイロンロッド
- 8 抗原固定化ナイロンロッド
- 9 基材
- 10 抗原固定化ナイロンシート
- 11 抗原固定化ナイロンシート
- 12 抗原固定化ナイロンシート

【図1】

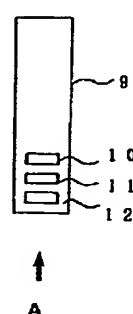
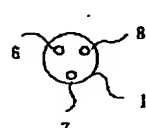
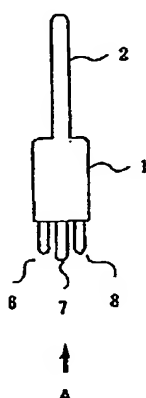
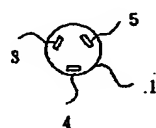
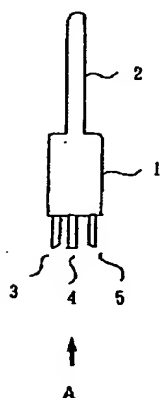
【図2】

【図3】

【図4】

【図5】

【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 花田 正子

京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ株  
式会社中央研究所内